

München 1960

Untersuchungen
zur hyaluronidasehemmenden
Wirkung des Heparins in vivo

von

KONRAD BAUER

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
München

Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Untersuchungen
zur hyaluronidasehemmenden Wirkung des Heparins
in vivo

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Konrad Bauer
aus
Altötting



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. H. Schwiegk

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 6. 60

Inhaltsverzeichnis

Problematik.....	4
Eigene Versuche.....	7
Statistische Auswertung.....	11
Diskussion.....	17
Zusammenfassung.....	18
Literaturverzeichnis.....	19



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Problematik

In früheren Arbeiten haben M a t h i e s und Mitarbeiter ¹⁻⁹ gezeigt, daß die Wirkung hyaluronidasehemmender Substanzen an eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark gebunden ist. Im einzelnen haben die Untersuchungen ergeben, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung der Salicylate, des Phenylbutazons, des Chlorbenzmethoxazons, der Glucokorticoide sowie der Moorbäder bei adrenalektomierten Ratten ausbleibt, bei hypophysektomierten Ratten dagegen erhalten ist. Nach diesen Untersuchungsergebnissen erscheint es zunächst, daß die Anwesenheit der Nebenniere für das Zustandekommen des hyaluronidasehemmenden Effektes entsprechend wirksamer Substanzen erforderlich ist. Nach Arbeiten von D o m e n j o z ¹⁰, M a t h i e s ⁷ und J u n g ¹¹ mit Bestimmungen des Ascorbinsäuregehaltes der Nebenniere, führen die genannten Substanzen zu einer Aktivierung der Nebennierenrinde, die jedoch bei hypophysektomierten Tieren nicht sichtbar ist, obwohl nach Hypophysektomie die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität erhalten bleibt. Damit ist erwiesen, daß die zwar vorhandene Stimulierung der Nebennierenrinde durch hyaluronidasehemmend wirksame Stoffe nicht für deren hyaluronidasehemmenden Effekt verantwortlich gemacht werden kann. Es blieb demnach anzunehmen, daß das Nebennierenmark, vermutlich durch eine Katecholaminausschüttung, die entscheidende Bedeutung beim Zustandekommen der Wirkung in vivo hyaluronidasehemmend wirksamer Substanzen besitzt. Diese Vermutung konnte durch Untersuchungen von M a t h i e s und Mitarbeiter ¹²⁻¹⁴ erhärtet werden, nach denen die Nebennierenmarkskatecholamine, Adrenalin und Noradrenalin, nicht nur bei intakten sondern auch bei adrenalektomierten Ratten eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität in der gleichen Größenordnung erzielen lassen, wie sie unter den genannten in vivo hyaluronidasehemmend wirksamen Stoffen auftritt. Die hierbei erforderlichen Mengen sind mit über 0,5 γ Adrenalin bzw. Noradrenalin /100 g Ratte äußerst gering. Beim Menschen haben M a t h i e s und W e i ß ¹⁵ mit 3 γ /kg noch eine deutliche Hyaluronidasehemmung gefunden. Auffällig bei diesen

Versuchen war, daß die Hyaluronidasehemmung erst längere Zeit nach Abklingen des an der Pupillenreaktion primären Katecholamineffektes sichtbar wurde, bzw. ihr Maximum erreichte¹⁴. Arbeiten von M a t h i e s und S c h l i e r f¹⁶ haben gezeigt, daß während einer Adrenalininfusion über mehrere Stunden bei adrenaletomierten Ratten keine Hyaluronidasehemmung sichtbar wird. Diese tritt vielmehr erst dann in Erscheinung, wenn die Infusion unterbrochen wird. Sie benötigt dann ebenfalls einen Zeitraum von etwa 45 Minuten, um in ihrem Maximalwert deutlich zu werden. Diese Befunde ließen die Annahme zu, daß in jedem Falle ein hyaluronidasehemmender Effekt erst nach Abfall eines erhöhten Adrenalinblutspiegels auf das Normalniveau sichtbar wird. Weitere Untersuchungen von M a t h i e s und S c h l i e r f¹⁶ mit kurzzeitigen zusätzlichen Adrenalinapplikationen während der Adrenalininfusion zeigten, daß auch der Abfall des Adrenalinblutspiegels auf ein bereits durch die Infusion überhöhtes Niveau, eine Hyaluronidasehemmung bewirkt.

Ferner haben M a t h i e s, F e c k e l m a n n und M e c k e l¹⁷ beweisen können, daß der Abfall des normalen Katecholaminblutspiegels auf einen niedrigeren Wert, wie es z.B. durch Reserpin bewirkt werden kann, einen hyaluronidasehemmenden Effekt zur Folge hat. Es kann demnach behauptet werden, daß generell der Abfall eines höheren Katecholaminblutspiegels auf ein niedrigeres Niveau eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität zur Folge hat. Nach diesen Feststellungen ist anzunehmen, daß nicht die Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark direkt die Hyaluronidasehemmung bewirkt, sondern daß beim darauf folgenden Abfall des Katecholaminblutspiegels eine Reaktionsfolge eingeleitet wird, bei der vermutlich weitere körpereigene Stoffe hyaluronidasehemmend wirksam werden.

Von M a t h i e s¹⁸, M a x e i n¹⁹ und Z i w a r i²⁰ wurde deshalb das Heparin näher untersucht, dessen hyaluronidasehemmende Wirkung auch in vitro nach M c C l e a n²¹, H a d i d i a n und P i r i e²², R o g e r s²³, S w y e r²⁴ und B e r g a m i n i²⁵ bekannt ist. Da der hyaluronidasehemmende Effekt des Heparins demnach auch in vitro sichtbar ist, erschien eine Mitwirkung im Anschluß an eine Katecholaminausschüttung beim Zustandekommen des hyaluronidase-

hemmenden Effekt in vivo hyaluronidasehemmender Substanzen möglich. M a t h i e s¹⁸, M a x e i n¹⁹ und Z i w a r i²⁰ haben festgestellt, daß Heparin in Dosen, die noch keine Gerinnungswirkung erkennen lassen, sowohl bei intakten als auch bei adrenaletomierten Ratten hyaluronidasehemmend wirksam ist. Diese hyaluronidasehemmende Wirkung des Heparins ist durch vorherige Gabe von Protaminsulfat als heparinaktivierender Substanz zu blockieren. Das Ergotamintartrat vermag als Adrenalytikum, das den hyaluronidasehemmenden Effekt des Adrenalins und Noradrenalins blockiert, das Ausmaß der Hyaluronidasehemmung des Heparins zwar abzuschwächen jedoch nicht aufzuheben. Diese Befunde lassen es möglich erscheinen, dem Heparin eine Rolle im Wirkungsablauf hyaluronidasehemmender Substanzen zuzuschreiben. Mit 1,5 I.E. Heparin i.v. wurde noch eine deutliche hyaluronidasehemmende Wirkung festgestellt. Bei geringeren Dosen erscheint die Wirkung nicht mehr sicher.

Um festzustellen, ob eine Heparinfreisetzung das letzte Glied der Reaktionskette darstellt, wurden in der vorgelegten Arbeit Versuche mit Heparininjektionen direkt in das Untersuchungsobjekt durchgeführt, das in diesem Falle Farbstoff-, bzw. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln darstellte. In den erwähnten Arbeiten von M a t h i e s und Mitarbeitern¹⁻⁹ wurde zur Bestimmung der Hyaluronidaseaktivität eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddelmethode herangezogen, wie sie auch der vorgelegten Arbeit zugrundegelegt wurde (siehe unten). Demnach war in den Versuchsreihen dieser Arbeit das Heparin direkt in die Quaddeln zu injizieren. Wenn eine Heparinfreisetzung letztlich die Hyaluronidasehemmung bedingen würde, so müßte Heparin, das direkt in die Quaddel injiziert wird, in wesentlich geringerer Menge eine Hyaluronidasehemmung deutlich werden lassen, wie es nach i.v. Gabe der Fall ist.

E-i g e n e V e r s u c h e

Methodik:

Die Hyaluronidaseaktivität wurde an der Ausbreitung einer Farbstoff-, Farbstoff+Heparin-, Farbstoff+Hyaluronidase- und Farbstoff+Heparin+Hyaluronidase-Quaddel ermittelt. Dabei wurde das Heparin bei den einzelnen Versuchsreihen in verschiedenen Mengen den Farbstoff- bzw. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln zugegeben und die Ausbreitung der Farbstoffflecken jeweils nach 10 Minuten bestimmt. Hierzu wurde die Bauchhaut männlicher, weißer Ratten im Gewicht von 130 - 185 g 24 Stunden vor dem Versuch mit Pilca enthaart. Die reine Farbstoffquaddel wurde mit 0,1 ccm einer 0,5 %igen Evansblaulösung streng intracutan gesetzt. Zur Herstellung der Farbstoff+Hyaluronidaselösung wurden in 2 ccm der oben genannten Farbstofflösung 150 I.E. Hyaluronidase (Kinetin) gelöst, sodaß bei der intracutanen Injektion von 0,1 ccm 7,5 I.E. Hyaluronidase zur Wirkung kamen. Die Farbstoff-Heparinlösung wurde bei der 1. Versuchsreihe durch Auffüllen von 0,5 ccm Heparin (2.500 I.E.) auf 20 ccm mit der oben genannten Endverdünnung der Farbstofflösung erreicht. Bei der intracutanen Injektion von 0,1 ccm dieser Lösung kamen 12,5 I.E. Heparin zur Wirkung. Bei der 2. und 3. Versuchsreihe wurden 0,05 (250 I.E.) bzw. 0,005 ccm (25 I.E.) Heparin auf 20 ccm gelöst und davon 0,1 ccm intracutan injiziert. Es kamen dabei bei der 2. Versuchsreihe 1,25 I.E. und bei der 3. 0,125 I.E. Heparin zur Applikation. In der 4. Versuchsreihe wurden 16,6 I.E. Heparin auf 20 ccm gelöst und wiederum 0,1 ccm in die Quaddel injiziert. In diesem Falle kamen 0,08 I.E. Heparin zur Wirkung.

Zur Herstellung der Farbstoff+Heparin+Hyaluronidaselösung wurden in 2 ccm der bei den einzelnen Versuchsreihen hergestellten Farbstoff+Heparin-Endverdünnungen 150 I.E. Kinetin gelöst und davon jeweils 0,1 ccm intracutan injiziert. Die nach 10 Minuten erreichte Ausbreitung der Farbstoffflecken wurde durch Übertragung der Konturen auf Zelluloidstreifen und anschließende planimetrische Ausmessung bestimmt. Naturgemäß zeigt die Farbstoff-Hyaluronidasequaddel eine weit raschere Ausbreitung als die reine Farbstoffquaddel, dagegen weist die Farbstoff+Hyaluronidasequaddel eine gewisse Hemmung auf, wenn eine hyaluronidasehemmende Sub-

stanz appliziert wird.

Die Versuche wurden in Narkose von 30 mg Evipan-Natricum/100 g Tier durchgeführt. Ein Einfluß von Barbituraten auf die Aktivität der Hyaluronidase besteht nach W i l h e l m i²⁵ nicht.

1. Versuchsreihe

Es wurde den Ratten eine reine Farbstoff-, die Farbstoff+Heparin-, die Farbstoff+Hyaluronidase- und die Farbstoff+Heparin+Hyaluronidasequaddel intracutan gesetzt und deren Ausbreitung nach 10 Minuten bestimmt. Bei dieser Versuchsreihe kamen 12,5 I.E. Heparin zur Wirkung. Die Einzelergebnisse sind aus der Tabelle 1 ersichtlich.

2. Versuchsreihe

Es wurden wiederum bei diesem Versuch die 4 Quaddeln gesetzt, jedoch wurden diesmal nur 1,25 I.E. Heparin direkt in die Farbstoff- bzw. Farbstoff+Hyaluronidasequaddel injiziert und nach 10 Minuten bestimmt. Die gefundenen Einzelwerte gehen aus der Tabelle 2 hervor.

3. Versuchsreihe

Bei diesen Versuchen kamen 0,125 I.E. Heparin zur Wirkung. Die 10 Minuten-Ausbreitung der 4 Quaddeln wurde festgehalten. Die Zahlen sind aus Tabelle 3 zu ersehen.

4. Versuchsreihe

Hier wurden nur 0,08 I.E. Heparin direkt in die Farbstoff- bzw. Farbstoff+Hyaluronidasequaddel injiziert. Die erzielten Zahlenwerte enthält die Tabelle 4.

Tier-Nr.	Gewicht in g	Farbst.- Quaddel	Farbst.+ Hep.-Quaddel	Farbst.+ Hyasequaddel	Farbst.+Hep.+ Hyasequaddel
I	156	116 mm ²	92 mm ²	176 mm ²	140 mm ²
II	150	124 mm ²	93 mm ²	180 mm ²	141 mm ²
III	146	112 mm ²	80 mm ²	160 mm ²	128 mm ²
IV	164	117 mm ²	91 mm ²	192 mm ²	136 mm ²

T a b e l l e 1

1.Versuchreihe:(12,5 I.E. Heparin)

Tier-Nr.	Gewicht in g	Farbst.- Quaddel	Farbst.+ Hep.-Quaddel	Farbst.+ Hyasequaddel	Farbst.+Hep.+ Hyasequaddel
I	175	116 mm ²	84 mm ²	184 mm ²	156 mm ²
II	175	112 mm ²	82 mm ²	180 mm ²	148 mm ²
III	147	116 mm ²	73 mm ²	184 mm ²	156 mm ²
IV	157	104 mm ²	68 mm ²	196 mm ²	144 mm ²
V	144	124 mm ²	96 mm ²	172 mm ²	148 mm ²
VI	185	133 mm ²	92 mm ²	164 mm ²	148 mm ²

T a b e l l e 2

2.Versuchsreihe:(1,25 I.E. Heparin)

Tier-Nr.	Gewicht in g	Farbstoff-Quaddel	Farbst.+Hep. Quaddel	Farbstoff+Hyasequaddel	Farbst.+Hep.+Hyasequaddel
I	165	108 mm ²	106 mm ²	180 mm ²	160 mm ²
II	133	109 mm ²	108 mm ²	164 mm ²	148 mm ²
III	142	92 mm ²	90 mm ²	172 mm ²	140 mm ²
IV	155	84 mm ²	85 mm ²	140 mm ²	132 mm ²
V	150	100 mm ²	98 mm ²	156 mm ²	144 mm ²

T a b e l l e 3

3.Versuchsreihe:(0,125 I.E. Heparin)

Tier-Nr.	Gewicht in g	Farbst.-Quaddel	Farbst.+Hep. Quaddel	Farbstoff+Hyasequaddel	Farbst.+Hep.+Hyasequaddel
I	156	92 mm ²	90 mm ²	170 mm ²	168 mm ²
II	150	108 mm ²	107 mm ²	163 mm ²	158 mm ²
III	164	106 mm ²	106 mm ²	182 mm ²	180 mm ²
IV	155	95 mm ²	96 mm ²	150 mm ²	148 mm ²
V	145	104 mm ²	102 mm ²	164 mm ²	160 mm ²

T a b e l l e 4

4.Versuchsreihe:(0,08 I.E. Heparin)

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

1. Statistisches Modell und Methodik

Primäre Aufgabe der statistischen Auswertung ist es, die Variabilität der beobachteten Meßwerte in diejenigen Anteile zu zerlegen, die einerseits durch systematische Faktoren, andererseits durch zufällige Faktoren hervorgerufen werden. In den vorliegenden Versuchen kommen als systematische Faktoren die einzelnen Versuchstiere und außerdem die einzelnen Quaddel-Typen in Frage. Bedeutet dementsprechend $x(V;QT)$ einen Meßwert, der am Versuchstier V und bei dem Quaddel-Typ QT beobachtet wurde, so verwenden wir ein lineares statistisches Modell zur Bestimmung des systematischen Einflusses dieser beiden Faktoren, wobei wir von dem Ansatz

$$x(V;QT) = a_V + b_{QT} + \epsilon$$

ausgehen. a_V und b_{QT} sind hierin konstante Parameter, wobei a_V ausschließlich vom jeweiligen Versuchstier, b_{QT} ausschließlich vom jeweiligen Quaddel-Typus abhängt und außerdem die beiden Parameter voneinander unabhängig sind. Die Größe ϵ bringt die zufälligen Abweichungen der beobachteten Meßwerte von den Erwartungswerten des Modelles zum Ausdruck. Zur Vervollständigung des Modelles ist es notwendig, über die Form dieser zufälligen Abweichungen noch gewisse Voraussetzungen zu machen; es muß ϵ eine normalverteilte Größe mit dem Erwartungswert 0 und der unbekannten Varianz σ^2 sein, wobei σ^2 unabhängig von den Versuchstieren und von den Quaddel-Typen sein muß.

Die Varianz der zufälligen Abweichungen stellt die Versuchs-Varia^b bilität dar, die sich aus experimentellem Fehler und biologischer Variabilität der Tiere hinsichtlich der Reaktion auf die Versuchsanordnung zusammensetzt. Die Größe dieser Versuchs-variabilität muß aus den Versuchs-Ergebnissen geschätzt werden, dies geschieht mit Hilfe von Varianz-Analysen, wobei die dort auftretende "Rest-Varianz" diese Schätzung darstellt. Die Bestimmung der Konstanten a_V und b_{QT} selber erfolgt mit Hilfe der "Methode der kleinsten Quadrate". Bedeutet $\bar{x}(QT)$ das arithmetische Mittel aller für den Quaddel-Typus ^{QT} beobachteten Meßwerte

einer Versuchsreihe, so ist, bei entsprechender Normierung der Konstanten a_V , diese Größe ein Schätzwert für den Parameter b_{QT} , d.h.

$$\bar{x}(QT) = b_{QT}.$$

Ein Einfluß des Heparins auf die Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel kann nur dann als statistisch gesichert gelten, wenn der zur Farbstoff+Heparin-Quaddel gehörige Parameter b_{FH} sich von dem Parameter b_F unterscheidet, der zur reinen Farbstoff-Quaddel gehört. Entsprechend liegt ein Einfluß des Heparins auf die Farbstoff+Hyase-Quaddel nur dann vor, wenn der Parameter b_{HH} der Farbstoff+Heparin+Hyase-Quaddel von dem Parameter b_H der Farbstoff+Hyase-Quaddel verschieden ist. Ob dies der Fall ist, kann nach Schätzung der Versuchsvariabilität mit Hilfe einer Varianz-Analyse durch Anwendung des DUNCAN-Testes geprüft werden. Dieser Test dient dazu, um im Anschluß an eine Varianz-Analyse simultan mehrere Mittelwerts-Differenzen dahingehend zu prüfen, ob sie statistisch wesentlich von 0 verschieden sind. Tatsächlich kann ja ein Unterschied zwischen den Parametern b_{FH} und b_F bzw. b_{HH} und b_H nur dann als statistisch gesichert gelten, wenn die zugehörigen Mittelwerts-Differenzen

$$\delta_F \bar{x} = \bar{x}(FH) - \bar{x}(F) \text{ und } \delta_H \bar{x} = \bar{x}(HH) - \bar{x}(H)$$

statistisch gesichert von 0 verschieden sind.

Die vorliegende Anordnung der Versuche läßt keine statistische Prüfung dafür zu, ob das gewählte statistische Modell den realen Sachverhalt in ausreichender Näherung wiedergibt. Dennoch ist es möglich, zumindest einen Anhaltspunkt dafür zu gewinnen, ob dies zutrifft. Bedeutet nämlich s_{QT}^2 die empirische Varianz, die zwischen den beobachteten Meßwerten eines Quaddel-Typus der gleichen Versuchsreihe besteht, so ergibt sich als Folgerung aus gewählten statistischen Modell, daß die zu verschiedenen Quaddel-Typen gehörigen empirischen Varianzen untereinander homogen sein müssen. Mit Hilfe des BARTLETT-Testes kann man nachprüfen, ob dieser Sachverhalt zutrifft. Ist dies nicht der Fall, so kann dies darauf hindeuten, daß das gewählte statistische Modell nicht dem realen Sachverhalt adäquat ist.

2. Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die Ergebnisse der Varianz Analysen, die zur Schätzung der Versuchs-Variabilität dienen, sind in den Tabellen 5-8 wiedergegeben. In den Schemata der Varianz-Analysen bedeutet hierbei

- n: die Zahl der Freiheitsgrade der jeweiligen Varianz-Komponente;
SAQ: das Summen-Abstandsquadrat der jeweiligen Varianz-Komponente;
MAQ: das Mittlere-Abstands-Quadrat der jeweiligen Varianz-Komponente;
 F_{emp} : der Varianz-Quotient zwischen der jeweiligen Varianz-Komponente und der Rest-Varianz;
p: die Überschreitungswahrscheinlichkeit, die dem Varianz-Quotienten F_{emp} in der zugehörigen F-Prüfverteilung zukommt.

Am Fuße jeder Varianz-Analyse ist das Ergebnis des zugehörigen BARTLETT-Testes angegeben, wobei n die Zahl der Freiheitsgrade der Chi-Quadrat-Prüfverteilung bedeutet, nach welcher die Prüfgröße χ^2_{emp} verteilt ist, wenn die Hypothese der Homogenität der Varianzen zutrifft. p ist auch hier die Überschreitungswahrscheinlichkeit, die der Prüfgröße χ^2_{emp} in der zugehörigen Prüfverteilung zukommt.

In den Tabellen 9-12 sind die Mittelwerte $\bar{x}(\text{QT})$, die zu jedem einzelnen Quaddel-Typus gehören, die empirischen Varianzen s^2_{QT} zwischen den für diesen Quaddel-Typus beobachteten Werten und die Mittelwertsdifferenzen $\delta.\bar{x}$ zwischen den beiden Farbstoff- bzw. zwischen den beiden Hyase-Quaddeln angegeben. Das Ergebnis des DUNCAN-Testes findet sich in diesen Tabellen in der Spalte "Sicherung", es ist dort angegeben, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit behauptet werden kann, die jeweilige Mittelwertsdifferenz $\delta.\bar{x}$ sei statistisch gesichert von 0 verschieden. Allerdings wurde diese Irrtumswahrscheinlichkeit nur dann angegeben, wenn sie nicht größer als 5% ist, da nur in diesem Falle von einer statistischen Sicherung gesprochen werden kann.

3. Besprechung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die Prüfgröße $\chi^2_{\text{emp.}}$ des BARTLETT-Testes besitzt bei keiner der Versuchsreihen in der zugehörigen Prüfverteilung eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die kleiner als 5% ist. Dies bedeutet, daß sich aus dem BARTLETT-Test kein Hinweis dafür ergibt, daß die untereinander verglichenen Varianzen nicht homogen seien. Es ergibt sich somit aus diesem Test auch kein Hinweis dafür, daß das gewählte statistische Modell dem realen Sachverhalt nicht adäquat sei.

Die Schätzungen der Versuchs-Variabilität, die mit Hilfe der Varianz-Analysen in den verschiedenen Versuchsreihen in Form der Rest-Varianz gewonnen wurden, erweisen sich untereinander als sehr homogen. Lediglich bei der Dosierung 1,25 I.E. Heparin ergibt sich eine etwas größere Rest-Varianz; eine Inspektion der Meßwerte zeigt, daß in dieser Versuchsreihe die Versuchstiere eine starke biologische Variabilität in ihrem Verhalten aufweisen. Die Ursache hierfür läßt sich statistisch selbstverständlich nicht klären. Ein statistischer Vergleich der verschiedenen Schätzungen der Versuchs-Variabilitäten zeigt jedoch, daß sich aus den vorliegenden Ergebnissen kein Anhaltspunkt dafür bietet, daß die Abweichungen zwischen den verschiedenen Schätzungen andere Ursachen als nur zufällige hat. Dementsprechend schien es gerechtfertigt, um eine bessere Schätzung der Versuchs-Variabilitäten zu erhalten, das gewogene Mittel aus den Einzel-Schätzungen zu bilden, wobei sich, bei $n = 48$ Freiheitsgraden die Schätzung $s^2 = 60,60$ ergab. Hieraus lassen sich die 95%-Vertrauensgrenzen für die Mittelwerts-Differenzen $\delta \cdot \bar{x}$ errechnen, wobei diese Vertrauensgrenzen noch von der Zahl der Versuchstiere abhängen, aus denen die Mittelwertsdifferenzen gewonnen wurden. Diese Vertrauensgrenzen haben bei 6 Versuchstieren den Wert $\pm 6,40 \text{ mm}^2$, bei 5 Versuchstieren den Wert $\pm 7,01 \text{ mm}^2$ und bei 4 Versuchstieren den Wert $\pm 7,83 \text{ mm}^2$. Die vorliegende Methode des SPREADING-Tests ist somit also in der Lage, mit vergleichsweise kleinen Tierzahlen bereits kleine Unterschiede in dem Verhalten des SPREADING- zu erfassen.

Hinsichtlich der übrigen Varianz-Komponenten der Varianz-Analysen sei hier nur bemerkt, daß ihnen für die Interpretation der vorliegenden Versuche unmittelbar keine Bedeutung zukommt. Es erübrigt sich daher, näher auf sie einzugehen.

Hinsichtlich der Wirkung der direkten Heparin-Applikation in die reine Farbstoff-Quaddel ergibt sich aus dem DUNCAN-Test, daß diese erst bei einer Dosierung von 1,25 I.E. eintritt. Für diese Dosis sowohl als auch für die höhere Dosis 12,5 I.E. liegt eine statistisch hoch gesicherte Verminderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Heparin-Quaddel gegenüber der reinen Farbstoff-Quaddel vor. Die Größe dieser Verringerung der Diffusionsgeschwindigkeit ergibt sich aus den Mittelwertsdifferenzen $\delta.. \bar{x}$, sie darf für beide Dosierungen als annähernd gleich angesehen werden.

Hinsichtlich des Einflusses der direkten Heparin-Applikation auf die Farbstoff+Hyase-Quaddel zeigt sich, dass hier bereits eine Hemmung in der Diffusion der Farbstoff+Hyase+Heparin-Quaddel bei einer Dosis von 0,125 I.E. Heparin eintritt. Dagegen läßt sich bei der niedrigeren Dosis von 0,08 I.E. Heparin eine solche Hemmung nicht feststellen. Für die übrigen 3 Dosen ist jedoch die Hemmung statistisch hoch gesichert. Bemerkenswert ist, daß die Zunahme dieser Hemmung, gemessen an den Mittelwertsdifferenzen $\delta.. \bar{x}$ zwischen den Dosen 0,125 I.E. und 1,25 I.E. sowie zwischen den Dosen 1,25 I.E. und 12,5 I.E. annähernd gleich ist, d.h., daß in diesem Falle bei geometrischer Progression der Dosen die Hemmung der Farbstoff+Hyase+Heparin-Quaddel gegenüber der Farbstoff+Hyase-Quaddel annähernd linear zunimmt. Dies entspricht dem in der Pharmakologie am häufigsten beobachteten Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung.

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	3	549	183	6.31	5%
Zwischen Quaddeln	3	16.366	5.455	100.00	0.1%
Rest - Varianz	9	265	29		

Gesamt - Varianz 15 17.180 1.145

$n = 3; \chi^2_{\text{emp.}} = 4.066; 20\% < p$

T a b e l l e 5
Versuchsreihe 1:(12,5 I.E. Heparin)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	159	32	-	
Zwischen Quaddeln	3	31.725	10.575	96.13	0.1%
Rest - Varianz	15	1.644	110		

Gesamt - Varianz 23 33.528 1.458

$n = 3; \chi^2_{\text{emp.}} = 3.335; 30\% < p$

T a b e l l e 6
Versuchsreihe 2:(1,25 I.E. Heparin)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	4	1.807	452	12.91	0.1%
Zwischen Quaddeln	3	16.235	5.411	100.00	0.1%
Rest - Varianz	12	419	35		

Gesamt - Varianz 19 18.461 972

$n = 3; \chi^2_{\text{emp.}} = 1.062; 70\% < p$

T a b e l l e 7
Versuchsreihe 3:(0,125 I.E. Heparin)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	4	938	234	4.87	5%
Zwischen Quaddeln	3	20.312	6.770	100.00	0.1%
Rest - Varianz	12	581	48		

Gesamt - Varianz 19 21.831 1.149

$n = 3; \chi^2_{\text{emp.}} = 2.085; 50\% < p$

T a b e l l e 8
Versuchsreihe 4:(0,08 I.E. Heparin)

	$\bar{x}(QT)$	s_{QT}^2	$\delta.. \bar{x}$	Sicherung
E_v	117	25		
E_{Hp}	89	36	- 28	1 %
H_v	177	175		
H_{Hp}	136	35	- 41	1 %

T a b e l l e 9
Versuchsreihe 1:(12,5 I.E. Heparin)

	$\bar{x}(QT)$	s_{QT}^2	$\delta.. \bar{x}$	Sicherung
E_v	117	100		
E_{Hp}	82	115	- 35	1 %
H_v	180	122		
H_{Hp}	150	24	- 30	1 %

T a b e l l e 10
Versuchsreihe 2:(1,25 I.E. Heparin)

	$\bar{x}(QT)$	s_{QT}^2	$\delta.. \bar{x}$	Sicherung
E_v	99	114		
E_{Hp}	97	99	- 2	-
H_v	162	237		
H_{Hp}	145	107	- 17	1 %

T a b e l l e 11
Versuchsreihe 3:(0,125 I.E. Heparin)

	$\bar{x}(QT)$	s_{QT}^2	$\delta.. \bar{x}$	Sicherung
E_v	101	50		
E_{Hp}	100	51	- 1	-
H_v	166	135		
H_{Hp}	163	143	- 3	-

T a b e l l e 12
Versuchsreihe 4:(0,08 I.E. Heparin)

D i s k u s s i o n

In den Versuchsreihen wurden Mengen von 12,5; 1,25; 0,125 und 0,08 I.E. direkt in die Farbstoff- bzw. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln injiziert. Die Ergebnisse zeigen, daß nur mit 12,5 bzw. höchstens noch 1,25 I.E. Heparin eine Hyaluronidasehemmung in der Größenordnung zu erzielen ist, wie sie nach i.v.-Gabe von 1,5 I.E./100 g auftritt. Eine Heparinfreisetzung von 0,125 I.E. in die Quaddel läßt bereits eine wesentlich geringere Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität erkennen und bei 0,08 I.E. ist eine Hemmung praktisch nicht mehr nachweisbar. Es liegt auf der Hand, daß die Heparinmenge, die noch eine maximale Hyaluronidasehemmung erzielen läßt, bei Injektion in die Quaddel eine wesentlich größere sein müßte, wenn man annehmen wollte, daß Heparin *als* letztes Glied einer Wirkungskette einer Reaktionsfolge nach Katecholamin-ausschüttung die Hyaluronidasehemmung bedingen würde. Die Heparinmenge, die bei i.v.-Injektion von 1,5 I.E./100 g bei gleichmäßiger Verteilung auf die der Quaddelgröße entsprechenden Hautoberfläche ankommen würde, wäre wahrscheinlich eine weit geringere. Es ist demnach anzunehmen, daß auch Heparin nur mittelbar am Zustandekommen des hyaluronidasehemmenden Effektes der von M a t h i e s und Mitarbeiter¹⁻⁹ geprüften hyaluronidasehemmenden Stoffe beteiligt ist.

Auffallend an den Ergebnissen der hier durchgeführten Versuchsreihen ist, daß Heparin in Dosierung von 12,5 und 1,25 I.E. bei Injektion in die Farbstoff- bzw. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln auch eine Hemmung der Ausbreitung der reinen Farbstoffquaddeln ohne Hyaluronidasebeimengung deutlich werden läßt. Diese Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Farbstoffquaddeln tritt bei der Dosierung von 0,125 I.E. Heparin nicht mehr in Erscheinung. Es ist zu diskutieren, ob Heparin in höherer Dosierung noch einen hyaluronidaseunspezifischen Effekt im Hinblick auf die Permeabilität ausübt.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Nach Ergebnissen früherer Arbeiten anderer Autoren wird festgestellt, daß die Wirkung der verschiedenen in vivo hyaluronidasehemmenden Substanzen an eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark gebunden ist. Dabei scheint die Katecholaminfreisetzung nicht direkt die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität zu bewirken. Die Katecholamine scheinen vielmehr einen Wirkungsblauf mit Freisetzung weiterer körpereigener Stoffe in Gang zu setzen, wobei dem Heparin eine gewisse Rolle zuzuschreiben ist. In der vorgelegten Arbeit wurden die Mengen Heparin, die bei Anwendung einer auf den SPREADING-Effekt beruhenden Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddelmetnode nach Injektion direkt in die Quaddeln noch eine maximale hyaluronidasehemmende Wirkung entfalten, ausgetestet und in Beziehung zu den Dosen gesetzt, die bei i.v.-Applikation notwendig sind, um einen hyaluronidasehemmenden Effekt erzielen zu lassen. Die Ergebnisse zeigen, daß nicht anzunehmen ist, daß Heparin als letztes Glied der durch die Katecholaminausschüttung eingang gesetzten Reaktionsfolge, die zur Auslösung der Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität führt, anzusehen ist. Ferner scheint Heparin in höheren Dosen einen hyaluronidaseunspezifischen Effekt auf die Ausbreitung der Farbstoffquaddeln zu besitzen.

Literaturverzeichnis

- 1) Mathies, H. u. Jankowski, A.: Med.Klin. 52 (1957), 1676
- 2) Mathies, H.: Arzneimittelforschung 8 (1958), 233
- 3) Mathies, H., Biechele u. Hartmann, M.: Ärzt.Forsch., im Druck
- 4) Mathies, H., v.Werther, G.: Arzneimittelforsch. 9, (1959) 576
- 5) Mathies, H.: Zschr.ges.exper. Med. 131, (1959) 118
- 6) Mathies, H., v.Werther, G.: Zschr. angew.Bäder-Klimahkde, 5,
(1958) 503
- 7) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, (1959) 308
- 8) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, (1959) 205
- 9) Mathies, H.: Pharmazie 14, (1959) 429
- 10) Domenjoz, R.: Arch.exper.Path.Pharmakol. 255, (1955) 14
- 11) Mathies, H., Jung, M.: Diss.München in Vorbereitung
- 12) Mathies, H., Glück, A., Poulantzes, J. u. Schmidt: Med.Exp.
1, (1959) 64
- 13) Mathies, H.: Ärztl.Forsch. XII (1958) 1/87
- 14) Mathies, H.: Arch.int.pharmacodyn. CXXII (1960) 334
- 15) Mathies, H. u. Weiß, G.: in Vorbereitung
- 16) Mathies, H. u. Schlierf, G.: in Vorbereitung
- 17) Mathies, H., Eckelmann, G. u. Meckel, E.: in Vorbereitung
- 18) Mathies, H.: in Vorbereitung
- 19) Maxein : Diss.München 1959
- 20) Ziware, P.: Diss.München, in Vorbereitung
- 21) McClean, D.: J.Pathol. 54, (1942) 284
- 22) Hadidian, Z. u. Pirie, N.W.: Biochem.J. 42, (1948) 266
- 23) Rogers, H.J.: Biochem.J. 40 (1946) 583
- 24) Swyer, G.I.M.: Biochem.J. 42, (1948) 32
- 25) Wilhelm, G. zitiert Domenjoz (10)

Ich danke Herrn Professor Dr. W. Seitz für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. H. Mathies für die Anregung zu dieser Arbeit und die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas. Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich bin ich für die Durchführung der statistischen Berechnung dankbar.

Am 16. März 1932 wurde ich in Altötting geboren, besuchte dort die Volksschule, anschließend die Oberrealschule in Mühldorf und legte im Juni 1950 die Reifeprüfung ab.

Nach einem zweijährigen Praktikum in den Farbwerken Hoechst begann ich im November 1952 das Studium der Biochemie. Im Sommersemester 1954 wechselte ich zur medizinischen Fakultät über und schloß mein vorklinisches Studium mit der ärztlichen Vorprüfung im Oktober 1956 ab. Nun folgten sechs klinische Semester an der Universität München. Im April 1960 beendete ich mein medizinisches Studium mit der ärztlichen Prüfung. In den Semesterferien famulierte ich an der chirurgischen und internen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Altötting.

Im Jahre 1958/59 war ich an der Medizinischen Poliklinik der Universität München mit der Bearbeitung meines Promotions-themas beschäftigt.

